



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 196 12 356 A 1

⑯ Int. Cl. 5:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53

DE 196 12 356 A 1

⑯ Aktenzeichen: 196 12 356.9
⑯ Anmeldetag: 28. 3. 96
⑯ Offenlegungstag: 2. 10. 97

⑯ Anmelder:
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,
07745 Jena, DE

⑯ Erfinder:
Wölfl, Stefan, Dr., 07768 Kahla, DE; Ermantraut,
Jewgeni, 07745 Jena, DE

DE 196 12 356 A 1

⑯ Optischer Nachweis von Hybridisierungs-Signalen

⑯ Ein neues Verfahren wird vorgestellt zum Nachweis von Nukleinsäuren mittels Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sonde durch einen chemisch an die Nukleinsäure oder die Nukleinsäure-Sonde gebundenen Liganden, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Hybridisierungspartner an einen festen Träger gebunden ist, als Liganden Substanzen ausgewählt werden, die mit hoher Affinität an einen makromolekularen Binder binden, und der Binder chemisch an Detektionskügelchen gekoppelt ist, die optisch detektierbar sind. Das Nachweisverfahren ist speziell zur Durchführung auf Matrizes geeignet und damit automatisierbar.

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Der Nachweis von Nukleinsäuren einer spezifischen Sequenz durch Hybridisierung ist eine der Standardmethoden der modernen Molekularbiologie. Mit dieser Technik werden z. B. einzelne Gene (oder Teile davon) in einer Präparation von genomischer DNA oder das Transkriptionsprodukt (mRNA) eines Gens in einer RNA-Präparation nachgewiesen [Meinkoth, J. and G. Wahl, Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports. Analytical Biochemistry, 1984. 138: p. 267 – 284; Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Vol. 2. 1989, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 13.96 – 13.97; Costanzo, C. and D. Gillespie, Fast Blots: Immobilization of DNA and RNA from Cells, in: Guide to Molecular Cloning Techniques, edited by S.L. Berger and A.R. Kimmel, Academic Press, Inc, San Diego: Methods in Enzymology, 1987. 152: p. 582 – 587; Wolf, S.E. et al, Rapid hybridization kinetics of DNA attached to submicron latex particles. Nucleic Acids Res, 1987. 15: p. 2911 – 2926; Schena, M., et al, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995. 270: p. 467 – 470]. Um den vielfältigen experimentellen Problemstellungen gerecht zu werden, wird diese Grundtechnik in einer Vielzahl von Variationen eingesetzt. Durch diese Untersuchungen können wichtige Informationen zum Aufbau eines Genoms, zur Aktivität einzelner Gene und zu Veränderungen erhalten werden, die z. B. mit der Tumorentstehung verbunden sind. Diese Techniken werden in vielen Bereichen eingesetzt: bei der Überprüfung gentechnischer Experimente, in der medizinischen Diagnostik, in der Pharmakologie und Toxikologie und in der Agrarwissenschaft.

Unter Hybridisierung versteht man die sequenzspezifische Anlagerung zweier sequenz-komplementärer DNA Strände. In auf Hybridisierung beruhenden Nachweisreaktionen für eine Nukleinsäuresequenz ist in der Regel ein Nukleinsäure-Strang markiert und der zweite an eine feste Phase gebunden. Die Markierung kann je nach Aufbau des Experiments sowohl an der Sonde (dem bekannte Nukleinsäure-Strang) als auch am Target (dem nachzuweisenden Nukleinsäure-Strang in einer gemischten Präparation) erfolgen. Die Markierung erfolgt gemäß dem Stand der Technik entweder durch radioaktive Markierung, durch fluoreszierende oder chemolumineszierende Moleküle oder durch Farbreaktionen. Als feste Phase, an die die Nukleinsäuren gekoppelt ist, wird in der Regel eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran eingesetzt. Die Stellen auf der Membran, an denen Hybridisierung erfolgt, werden durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm oder durch die direkte Beobachtung der Fluoreszenz oder der Farbreaktion nachgewiesen. So kann zum Beispiel die Bindung von Streptavidin an Biotin (US 2915082, EP 63879), das an die Nukleinsäure gekoppelt ist, aber auch die Bindung eines Antikörpers an ein an die Nukleinsäure gebundenes Hapten als Hybridisierungsnachweis eingesetzt werden (EP 173251, EP 128018). Das Streptavidin (bzw. der Antikörper) ist mit einem Enzym gekoppelt, dessen Aktivität über gekoppelte Farbstoffsysteme nachgewiesen werden kann. Die Verwendung eines Linkers zwischen dem Hapten und der Nukleinsäure-Sonde verbessert die Nachweisempfindlichkeit deutlich (DE 38 13 278).

Die beschriebenen Verfahren sind kaum geeignet zum Aufbau eines einfachen Nachweisverfahrens von

Nukleinsäuren in kleinsten Volumina und zur optischen Auswertung, einer Voraussetzung für den Aufbau automatisierter Detektionssysteme. Auch ist die simultane, parallele Analyse einer Vielzahl von Nukleinsäure-Sequenzen in einem kleinen Probenvolumen mit den bisherigen Nachweisreaktionen nur begrenzt möglich.

Es besteht daher ein Bedarf nach einem einfachen, automatisierbaren Nachweisverfahren für Nukleinsäure-Hybridisierungen. Die vorliegende Erfindung stellt ein derartiges einfache handhabbares Verfahren zur Verfügung.

Die Erfindung betrifft dementsprechend ein neues Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mittels Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sonde durch einen chemisch an die Nukleinsäure oder die Nukleinsäure-Sonde gebundenen Liganden, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Hybridisierungspartner an einen festen Träger gebunden ist, als Liganden Substanzen ausgewählt werden, die mit hoher Affinität an einen makromolekularen Binder binden, und der Binder chemisch an Detektionskügelchen gekoppelt ist, die optisch detektierbar sind.

Die erfindungsgemäße Methode erlaubt den einfachen Nachweis von Hybridisierungssignalen durch Beobachtung mit dem Auge oder mit einem Lichtmikroskop. Durch eine entsprechende apparative Ausstattung ist es auch möglich, die Signale vollautomatisch zu erfassen und zu verarbeiten. So wird ein hoher Probendurchsatz und eine leichte Speicherung der anfallenden Daten möglich. Die Detektion unter dem Lichtmikroskop ohne den Einsatz toxischer Substanzen erlaubt es, dieses Nachweisverfahren von spezifischen Nukleinsäuren vielseitig einzusetzen.

Als fester Träger werden gängige Objektträger aus lichtdurchlässigem Material (z. B. Glas) im Durchlichtverfahren eingesetzt. Bei Verwendung eines Auflichtmikroskops oder bei der Detektion mit dem Auge können auch lichtundurchlässige Träger (z. B. aus Glas, üblichen Kunststoffen oder Silizium) verwendet werden.

Je nach Fragestellung können entweder die zu untersuchenden Nukleinsäuren oder die Nukleinsäuresonden auf dem Träger immobilisiert werden. Im folgendem wird die letztere Variante näher beschrieben. Die andere Variante ist in analoger Weise durchführbar.

Durch gezieltes Immobilisieren der Sonden auf dem Träger erhält man eine Detektionsmatrix, die die gleichzeitige Detektion einer Vielzahl von Nukleinsäuresequenzen erlaubt. Die Detektionsmatrix ist dabei wie folgt aufgebaut:

Der Träger wird in quadratische Felder mit einer Kantenlänge im μm -Bereich (z. B. $500 \mu\text{m}$) aufgeteilt. Auf jedes dieser Felder wird eine Nukleinsäure-Sonde bekannter Sequenz (z. B. synthetisierte Oligonucleotide) aufgebracht und dort immobilisiert.

Das Auftragen der Nukleinsäuren auf die einzelnen Felder kann durch manuelles Pipetieren, durch Pipettieren mit einer automatischen Pipetteneinrichtung oder lithographisch z. B. mit Hilfe eines Stempels erfolgen. Abb. 1 zeigt eine Matrix mit Feldern, an die jeweils Nukleinsäure-Sonden einer spezifischen Sequenz gebunden sind, und nukleinsäurefreien Zwischenräumen. Jedem Feld (x/y) kann eine spezifische Nukleinsäure-Sequenz zugeordnet werden. Die Bindung der Nukleinsäure-Sonden auf den einzelnen Feldern erfolgt in an sich bekannter Weise durch kovalente chemische Bindung, abhängig vom verwendeten Trägermaterial. Dazu werden die Nukleinsäuren mit einer Kopplungsgruppe (z. B.: Amino- (NH_2); Thio- (SH) oder Carboxy- (COOH)

Gruppe) hergestellt, die direkt am 5'-Ende der Nukleinsäuresonde eingebaut wurde oder über einen Linker (z. B. $(-\text{CH}_2-)_n$ oder $(-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$; $n=1-25$) mit der Nukleinsäure verbunden ist. Beispiele dafür sind Aminolinker ([N-trifluoracetomido-(3-oxa)-pentyl-N,N-diisopropyl-methyl]phosphoramidite, Boehringer Mannheim) und Thiolinker (5'-thiol-modifier C6, Glen Research, Inc.). Der Träger wird für die Kopplung ebenfalls durch eine geeignete Kopplungsgruppe mit oder ohne Linker aktiviert. Geeignete Kopplungsgruppen sind z. B. Gold, ferner Epoxygruppen oder Tosylgruppen (z. B. Glycidoxypropylytrimethoxysilan, Fluka). Es können auch mit einem Polymer (z. B. Dextran, Polylysin) beschichtete Träger eingesetzt werden. Die Nukleinsäuren müssen so auf dem Träger befestigt sein und die Linker müssen an einer Position der Nukleinsäuren gekoppelt sein, daß die Basenpaarung zwischen zwei Nukleinsäuresträngen nicht beeinflußt wird. Nach der Immobilisierung der Nukleinsäure-Sonden kann der Träger unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt werden. Je nach Fragestellung können verschiedene Nukleinsäure-Sonden eingesetzt werden. Die kontrollierte Auswahl der Sonden erlaubt es, einen der Fragestellung angepaßten Datensatz zu sammeln. Die so hergestellten Nukleinsäuredetektionsträger (im weiteren Träger) können nun zum Nachweis der gesuchten Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden.

Als zu testende Nukleinsäuregemische (im weiteren Tester-Lösung) können, z. B. Gesamt-RNA-Präparationen, polyadenyierte mRNA, cDNA, genomische DNA oder Amplifizierungsprodukte dieser Präparationen aus den verschiedensten Quellen eingesetzt werden.

Zur sequenzspezifischen Hybridisierung wird der Träger mit der Tester-Lösung (wenige μl reichen, um eine 1.6 mal 1.6 cm große Fläche ausreichend zu bedekken) überschichtet und für die Hybridisierung mit einem Deckglas zum Schutz vor Evaporation bedeckt. Nach Inkubation, wenn erforderlich bei erhöhter Temperatur, werden durch Waschen mit einer üblichen Pufferlösung die nicht hybridisierten Nukleinsäuren der Tester-Lösung entfernt.

Zur Detektion ist es nun erforderlich, Hybride zwischen den Nukleinsäure-Sonden auf dem Träger und Nukleinsäuremoleküle aus der Tester-Lösung sichtbar zu machen. Dies erfolgt durch Inkubation mit einer Suspension, die wenige μm große (0,5–10 μm) sphärische Kugelchen, vorzugsweise lichtundurchlässige Kugelchen, enthält. Diese Kugelchen sind im Lichtmikroskop sichtbar und können unter anderem durch unterschiedliche Färbung oder Fluoreszenz spezifisch markiert sein. Diese Kugelchen sind über Linker mit Molekülen (z. B. Streptavidin, Antikörper gegen ein Hapten) gekoppelt, die hoch spezifisch an einen Liganden binden (z. B. Biotin, Hapten). Im folgendem werden diese Kugelchen Detektions-Kugelchen genannt. Biotin bzw. das Hapten (z. B. Digoxin, Digoxigenin) finden sich nur auf den Feldern, auf denen Hybride zwischen Nukleinsäuren der Tester-Lösung und Nukleinsäuren des Trägers gebildet wurden (Abb. 2). Die Bindung der Detektions-Kugelchen erfolgt nur auf den Feldern, auf denen sich Biotin bzw. geeignete Hapten-Moleküle befinden. Eine Anhäufung von Detektions-Kugelchen ist daher spezifisch für Felder, auf denen eine Hybridisierung erfolgt.

Die Hapten- bzw. Biotin-Markierung kann mit folgenden Schritten angebracht werden.

A. Die Nukleinsäuremoleküle der Testerlösung sind bereits markiert. Die Markierung kann bei der

cDNA-Synthese, bei einem anderen analogen Amplifizierungsverfahren durch Biotin/Hapten markierte Nukleosid-Triphosphat, durch eine Reaktion mit Terminaler-Transferase und einem markierten Nukleosid-Triphosphat, oder durch eine lichtaktivierbare oder chemische Kopplung eingebaut werden. Erfolgt die Hybridisierung zwischen einem Nukleinsäuremolekül der Tester-Lösung und einer Nukleinsäure-Sonde auf dem Träger, befinden sich Biotin-Tags oder Hapten-Tags auf dem für diese Sonde spezifischen Feld.

Die oben beschriebenen Detektions-Kugelchen binden nun spezifisch an dieses Feld und die Anreicherung kann beobachtet und gemessen werden.

B. Die Hybridisierung erfolgt mit unmarkierten Nukleinsäuremolekülen in der Tester-Lösung. Nach dem Waschen zum Entfernen nicht hybridisierter Nukleinsäuren wird der Träger mit einer Reaktionslösung überschichtet, die eine Polymerase und ein bis vier Biotin/Hapten-markierte dideoxy-Nukleosid-Triphosphate enthält. An geeigneten Hybriden befinden sich im Anschluß an das 3'-Ende der Nukleinsäuresonde nicht gepaarte Basen auf dem komplementären Tester-Nukleinsäurestrang. An dieser Stelle kann nun ein zur nächsten Base der Tester-Nukleinsäure komplementäres Nukleosid an das 3'-Ende der Nukleinsäure-Sonde eingebaut werden.

Wie oben können nun Detektions-Kugelchen auf diesem Feld binden.

Eine Anhäufung dieser Kugelchen auf einer Position (Feld) des Objektträgers zeigt in beiden Varianten eine erfolgte Hybridisierung. Der Nachweis ermöglicht zunächst die Unterscheidung zwischen erfolgter Hybridisierung und keiner Hybridisierung. Liegt die Anzahl der Hybride unter der Menge, die zu einer Sättigung der Nachweis-Fläche mit Detektions-Kugelchen führt, kann das Ausmaß der Anhäufung (Menge der Kugelchen) zur Quantifizierung der gebildeten Hybride benutzt werden. Daraus kann die Konzentration der zur jeweiligen Sonde komplementären Nukleinsäuren in der Tester-Lösung bestimmt werden. Durch farbige Markierung der Kugelchen ist auch eine serielle oder parallele Analyse mehrerer Reaktionen auf einem Träger möglich.

Durch den Einsatz von fluoreszierenden Detektions-Kugelchen kann eine Träger/Detektions-Kugelchen Kombination zur Verfügung gestellt werden, die eine Detektion mit bloßem Auge unter einer geeigneten angeregenden Lichtquelle (z. B. UV) erlaubt. In diesem Fall werden die Felder auf dem Träger so angeordnet (Abstand ca. 2–5 mm), daß auch ohne eine Vergrößerung die genaue Zuordnung eines Fluoreszenzsignals zu einer Art von Nukleinsäure-Sonde erlaubt.

Beispiele

Beispiel 1

Vorbereitung des Trägers

Auf einen mit Gold beschichteten Träger werden Nukleinsäure-Sonden über eine Thiol-Gruppe gekoppelt, die sich am 5'-Ende der Nukleinsäuren befindet. Die Nukleinsäure-Moleküle, werden mit einem Stempel aus Agarose so aufgebracht, daß sich auf den einzelnen Feldern der Matrix immer nur eine Art von Nukleinsäure-Sonden befindet. An Position (1, 1) befindet sich Nu-

kleinsäure-Moleküle mit einer Sequenz spezifisch für das menschliche Onkogen c-myc; an Position (1, 2) für das Onkogen c-fos; an Position (1, 3) für c-jun; an Position (2, 1) für β -Actin; an Position (2, 2) für β -Globin; an Position (2, 3) für Luziferase.

Alle Nukleinsäuresonden haben eine Länge von ca. 30 Nukleotiden und werden so gewählt, daß die gebildeten Doppelhelices mit Nukleinsäure-Molekülen aus der Testerlösung einen Schmelzpunkt von 58°C haben.

Vorbereitung der Tester-Lösung

Aus der menschlichen Zelllinie U937 wird die polyadenyierte mRNA durch Bindung an eine Oligo-dT-Matrix isoliert. Mit Hilfe von Hexamer-Primern, die alle möglichen Sequenzen enthalten, werden in Anwesenheit eines Biotin-markierten Nukleosid-Triphosphats (Biotin-21-dUTP, Clontech) repräsentative cDNA-Moleküle durch reverse Transkription hergestellt. Die so erhaltenen Biotin-markierten cDNA-Moleküle werden in einem Hybridisierungspuffer (0,5 M (Na⁺)-Phosphat pH 7,2, 7% Natriumlaurylsulfat, 0,5% Rinderserum-Albumin, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Hybridisierung

Mit (ca. 30 μ l) dieser Lösung wird der Träger überschichtet, mit einem Deckglas versiegelt und bei 58°C inkubiert. Nicht gebundene Nukleinsäuren der Tester-Lösung werden durch mehrmaliges Waschen mit einer auf 55°C erwärmten Waschlösung (0,1 M (Na⁺)-Phosphat pH 7,2, 1% Natriumlaurylsulfat, 1 mM EDTA) entfernt.

Binden der Detektions-Kügelchen

Der Träger wird mit (ca. 30 μ l) einer Suspension von an Streptavidin gebundener Detektions-Kügelchen (Streptavidin-Latex-Beads, MoBiTec) überschichtet. Nach kurzer Inkubationszeit (ca. 30 min) werden durch Waschen mit einer Waschlösung (40 mM (Na⁺)-Phosphat pH 7,2) die nicht gebundenen Kügelchen entfernt.

Detektion

Die Träger werden nun unter ein Mikroskop gelegt. Auf Feldern, die mit Detektions-Kügelchen bedeckt sind, ist eine Hybridisierung zwischen Nukleinsäure-Molekülen der Tester-Lösung und Nukleinsäure-Sonden des Trägers erfolgt. Die zu den Sonden korrespondierenden Gene werden daher in der untersuchten Zelle transkribiert.

Beispiel 2

Wie Beispiel 1, außer:

- Alle Nukleinsäure-Sonden werden über das 5'-Ende immobilisiert. Dadurch sind die 3'-OH-Enden der Nukleinsäure-Sonden auf dem Träger frei zugänglich.
- Es wird keine cDNA-Synthese durchgeführt. Die Tester-Lösung enthält direkt die poly-adenyierte mRNA aus den U937 Zellen.
- Nach dem Hybridisierungsschritt wird der Träger mit einem Puffer für die reverse Transkription überschichtet. Der Puffer enthält neben dem En-

zym Reverse-Transkriptase auch ein mit Biotin markiertes Nukleosid-Triphosphat (Biotin-21-dUTP, Clontech). Die 3'-Enden der Nukleinsäure-Sonden werden so gewählt, daß, wenn das richtige Molekül hybridisiert, der Einbau von dUTP erfolgen kann. Das heißt, auf den RNA-Molekülen aus der Tester-Lösung folgt auf die zur Sonde komplementären Sequenz in Richtung des 5'-Endes ein Adenosin. Dieser Schritt erlaubt eine zusätzliche Differenzierung der gebildeten Hybride.

Bindung der Detektions-Kügelchen und Detektion wie in Beispiel 1.

Beispiel 3

Wie Beispiel 2, außer:

- Für die reverse Transkription werden 2 verschiedene Nukleosid-Triphosphate mit Biotin- bzw. Digoxigenin-Markierung (Digoxigenin-16-dATP, Biotin-16-ddUTP, Boehringer Mannheim) zugegeben. Je nach Sequenz der hybridisierten RNA-Moleküle wird ein anderes Nukleosid eingebaut.
- Durch Verwendung unterschiedlich markierter Detektions-Kügelchen (mit Streptavidin – rot; mit anti-Digoxigenin-Antikörper – grün) können unterschiedliche Bindungen der Detektions-Kügelchen beobachtet werden.

Beispiel 4

Wie Beispiel 2, außer:

- Es wird zunächst durch reverse Transkription mit poly-dT-Primern [(dT)18G, (dT)18C, und (dT)18A] nicht markierte cDNA synthetisiert. Diese wird als Tester-Lösung zur Hybridisierung eingesetzt.
- Der Einbau der markierten Nukleoside erfolgt analog zu Beispiel 2. Es wird jedoch anstelle der Reversen-Transkriptase eine DNA abhängige Polymerase (T7-DNA-Polymerase) eingesetzt.

Beispiel 5

Wie Beispiel 4, außer:

- Es werden fluoreszierende Detektions-Kügelchen (MoBiTec) verwendet, die durch Anregung mit einer UV-Licht-Quelle fluoreszieren. Die Matrix-Felder (Positionen), die mit der Nukleinsäure-Sonde (siehe Beispiel 1) belegt sind, werden in einem Abstand von 3 mm angeordnet. Die Fluoreszenz kann so mit dem Auge einer definierten Position zugeordnet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren mittels Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sonde durch einen chemisch an die Nukleinsäure oder die Nukleinsäure-Sonde gebundenen Liganden, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Hybridisierungspartner an einen festen Träger gebunden ist, als Liganden Substanzen ausgewählt werden, die mit hoher Affinität an einen makromolekularen Binder binden, und der Binder

chemisch an Detektionskügelchen gekoppelt ist,
die optisch detektierbar sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als fester Träger Glas, Kunststoff
oder Silizium eingesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Detektionskügelchen einen
Durchmesser von 0,5—10 μm haben.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß fluoreszierende Detektionskügelchen 10
verwendet werden, die unter einer anregenden
Lichtquelle mit dem Auge erkennbar sind.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß lichtundurchlässige oder farbige De-
tektionskügelchen verwendet werden, die im Licht- 15
mikroskop erkennbar sind.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als Nukleinsäuren RNA, cDNA oder
genomische DNA eingesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 20
zeichnet, daß als Nukleinsäure-Sonden syntheti-
sche Oligonucleotide bekannter Sequenz einge-
setzt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als makromolekulare Binder Proteine 25
oder Peptide verwendet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als makromolekulare Binder Strepta-
vidin oder ein Antikörper verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 30
zeichnet, daß als Ligand Biotin oder ein Hapten
verwendet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als Hapten Digoxin oder Digoxyge-
nin verwendet wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 35
zeichnet, daß einer der Hybridisierungspartner di-
rekt oder über einen Linker an den festen Träger
gebunden ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 40
zeichnet, daß der makromolekulare Binder über ei-
nen Linker an die Detektionskügelchen gebunden
ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 12 oder
13, dadurch gekennzeichnet, daß eine der Nuklein- 45
säuren so auf dem festen Träger befestigt ist und
die Linker an einer solchen Position der Nuklein-
säuren gekoppelt sind, daß die Basenpaarung zwi-
schen zwei Nukleinsäuresträngen nicht beeinflußt
wird.

50

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

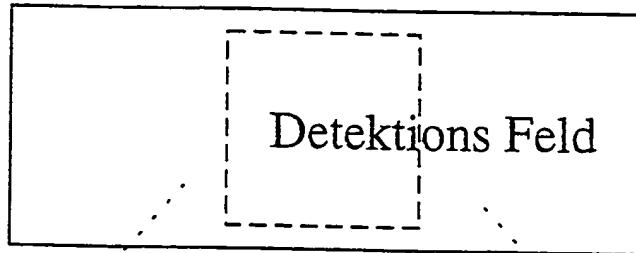
55

60

65

- Leerseite -

Träger:



Ausschnitt (Vergrößert):

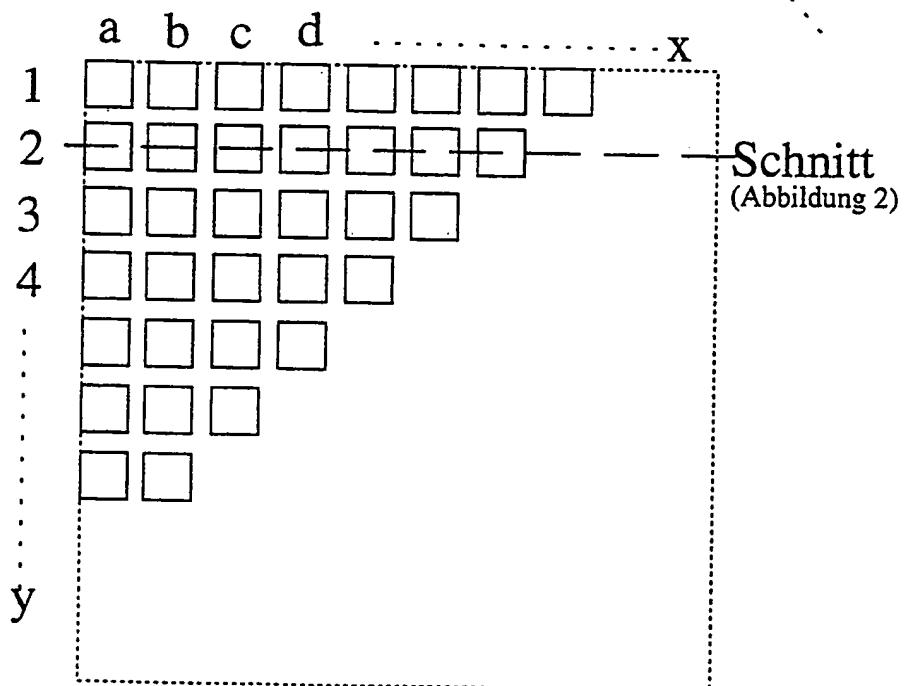
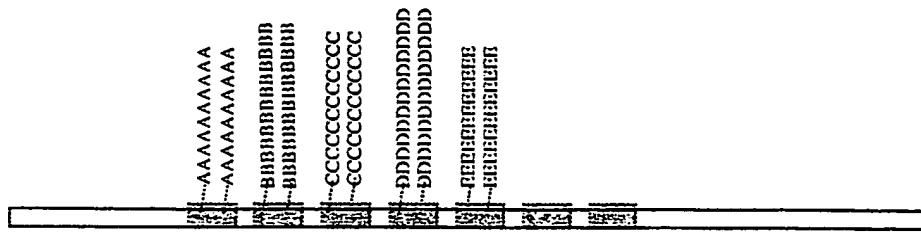


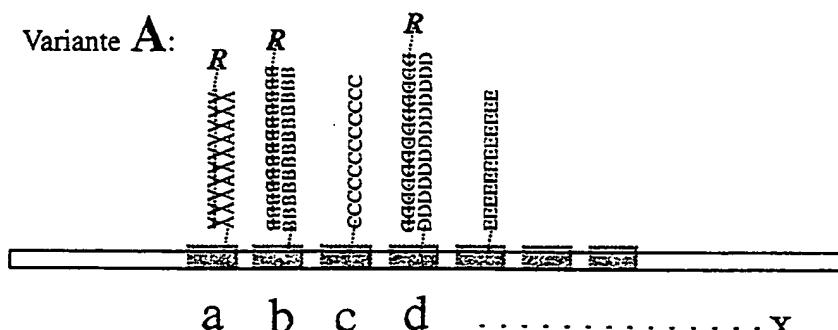
Abbildung 1

Schnitt durch den Träger:



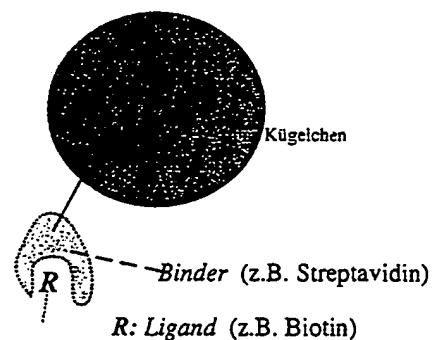
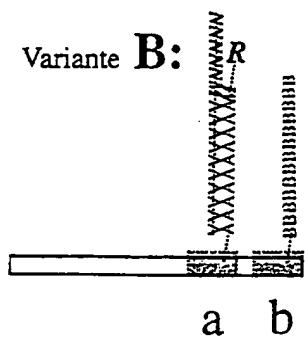
a b c d x

Variante A:



a b c d x

Variante B:



Die Darstellungen sind nicht Maßstabsgetreu.
 Großbuchstaben repräsentieren Nukleinsäure-
 Moleküle. Komplementäre Moleküle sind mit
 durchgestrichenen Buchstaben dargestellt.

Abbildung 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.